

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Offenlegungsschutzamt

(10) DE 44 40 200 A 1

(51) Int. Cl. 6:

A01H 5/00

A 01 H 1/06

C 12 N 15/63

C 12 N 15/82

C 12 N 15/60

C 12 N 1/00

C 12 N 1/21

// (C12N 1/21,C12R
1:19)G01N 33/50

(21) Aktenzeichen: P 44 40 200.7

(22) Anmeldetag: 10. 11. 94

(43) Offenlegungstag: 15. 5. 96

(71) Anmelder:

Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

(72) Erfinder:

Hain, Rüdiger, Dipl.-Biol. Dr., 40764 Langenfeld, DE;
Fischer, Regina, Dipl.-Biol., 51063 Köln, DE

(54) DNA-Sequenzen und ihre Verwendung

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue DNA-Sequenz und ihre Verwendung zur Transformation von Vektoren, Wirtsorganismen und Pflanzen sowie zur Erzeugung von neuen Pflanzen, die männlich steril sind und eine veränderte Blütenfarbe aufweisen.

DE 44 40 200 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 03. 96 602 020/167

20/33

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue DNA-Sequenz und ihre Verwendung zur Transformation von Vektoren, Wirtsorganismen und Pflanzen sowie zur Erzeugung von neuen Pflanzen, die männlich steril sind und eine veränderte Blütenfarbe aufweisen.

Männlich sterile Pflanzen spielen in der Pflanzenzüchtung, insbesondere in der Hybridzüchtung, eine bedeutende Rolle. Verschiedene Verfahren zur Erzeugung von männlich sterilen Pflanzen sind bereits bekannt geworden, gemäß welchen beispielsweise gezielt Zellschäden z. B. in den Antheren hervorgerufen werden, Eingriffe in mitochondriale Funktionen erfolgen, mit Hilfe von Antisense-DNA sterilisierende Einwirkungsmöglichkeiten v. n Chemikalien geschaffen werden oder die Chalkonsynthese inhibiert wird (vgl. WO 90/08830, WO 90/08831, WO 89/10396, EP-A-0 329 308 und EP-A-0 335 451). Die bisher zur Erzeugung von männlich sterilen Pflanzen zur Verfügung stehenden Verfahren führen jedoch in vielen Fällen nicht zu voll befriedigenden Ergebnissen. Darüberhinaus werden häufig Pflanzen mit einer erheblich gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber pilzlichen Schädlingen erhalten, was ihre praktische Handhabung in einem hohen Maße erschwert.

Es besteht somit ein starkes Bedürfnis nach weiteren Verfahren zur Erzeugung von männlich sterilen Pflanzen, welche diese Nachteile nicht aufweisen.

Die Erzeugung von Pflanzen mit einer geänderten Blütenfarbe ist vor allem für die Zierpflanzenzüchtung von Interesse, so daß auch hier ein erhebliches Interesse an neuen Verfahren besteht.

Es wurde nun die neue DNA-Sequenz, welche im folgenden DNA-Sequenz I genannt wird, gefunden, die aus den folgenden Bestandteilen besteht, die in der 5'-3'-Reihenfolge aneinander gereiht sind:

- a) ein zum Bestandteil b) heterologer Promotor, der in Pflanzen stark wirksam ist und/oder der antheren- oder tapetum-spezifisch ist und dem gegebenenfalls ein verstärkendes Element ("Enhancer") vorgesetzt ist;
- b) eine für Stilbensynthase kodierende DNA-Sequenz; und
- c) eine 3'-Polyadenylierungssequenz;

wobei der Begriff DNA-Sequenz I auch die abgeleiteten DNA-Sequenzen einschließt, welche noch die für die Ausführung der Erfindung wesentlichen Merkmale aufweisen.

Weiterhin wurde gefunden, daß Pflanzen, die die DNA-Sequenz I in ihrem Genom enthalten, in überraschender Weise männlich steril sind und darüberhinaus eine, gegenüber den entsprechenden Pflanzen, die die DNA-Sequenz I nicht enthalten, veränderte Blütenfarbe aufweisen.

Diese neuen Pflanzen besitzen zusätzlich eine erhöhte Resistenz gegenüber mikrobiellen Pflanzenschädlingen, insbesondere gegenüber phytopathogenen Pilzen. Die geänderte Blütenfarbe erleichtert es in vielen Fällen, die männlich sterilen Pflanzen in einer gemischten Population leicht zu erkennen, was von einer erheblichen praktischen Relevanz sein kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch neue Pflanzen (einschließlich Teile dieser Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasmata, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklingen usw.), die in ihrem Genom die DNA-Sequenz I enthalten und die männlich steril sind und/oder eine gegenüber den entsprechenden Pflanzen, welche die DNA-Sequenz I nicht enthalten, geänderte Blütenfarbe aufweisen.

Erfundungsgemäß als Bestandteil a) der DNA-Sequenz I verwendbare Promotoren, die in Pflanzen stark wirksam sind, sind bekannt. Als Beispiel kann der Promotor des Gens der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase (rbcS) genannt werden (vgl. z. B. EMBO Journal, Vol. 5 Nr. 9, 2063–2071 (1986)). Weiterhin können auch in Pflanzen stark wirksame Promotoren von Pflanzenviren eingesetzt werden. Solche Promotoren sind bekannt, wobei der CaMV 35S Promotor (vgl. z. B. Science 250: 959–960 (1990)) beispielhaft genannt sei.

Als Bestandteil a) der DNA-Sequenz I können auch antherenspezifische und/oder tapetumspezifische Promotoren verwendet werden. Solche Promotoren, die ihre Wirksamkeit besonders stark in den Antheren bzw. im Tapetum genannten Antherenort entfalten, sind bekannt. Als Beispiel soll der TA29-Promotor genannt werden (vgl. z. B. Nature 347, 737–741 (1990)). Auch die bekannten, aus Tabak isolierten, antherenspezifischen Promotoren der TA26 und TA13 Gene kommen für eine erfundungsgemäße Verwendung in Frage.

Erfundungsgemäß bevorzugt wird der CaMV 35S Promotor als Bestandteil a) der DNA-Sequenz I eingesetzt. Es kann vorteilhaft sein, dem Promotor ein geeignetes Verstärkungselement (Enhancer) voranzustellen, um die erwünschte Wirkung des Promotors zu verstärken. Solche Enhancer-Promotor-Konstrukte sind bekannt. Als Enhancer kann beispielweise der bekannte CaMV 35S Enhancer besonders vorteilhaft eingesetzt werden.

Besonders bevorzugt wird erfundungsgemäß als Bestandteil a) der DNA-Sequenz I der CaMV 35S Promotor verwendet. Ganz besonders bevorzugt wird ein Konstrukt eingesetzt, welches aus dem CaMV 35S Enhancer und dem sich in 5'-3'-Reihenfolge anschließenden CaMV 35S Promotor besteht.

Der erfundungsgemäß zu verwendende Promotor ist zum Bestandteil b) heterolog, d. h. von Promotoren, die in natürlichen Stilbensynthase-Genen vorkommen, verschieden.

Die Isolierung geeigneter Promotoren und Enhancer ist bekannt oder kann nach bekannten Verfahren und Methoden, die dem Fachmann geläufig sind, erfolgen.

Als Bestandteil b) in der DNA-Sequenz I kann jede DNA verwendet werden, die für das Enzym Stilbensynthase kodiert. Unter Stilbensynthase soll jedes Enzym verstanden werden, welches (in einer geeigneten Umgebung, vor allem in Pflanzenzellen) Stilbene erzeugen kann. Der Begriff Stilbene beschreibt eine Gruppe von chemischen Substanzen, welche in Pflanzen vorkommen und als gemeinsame Grundstruktur das Stilbengerüst (trans-1,2-Diphenylethylidene) enthalten. Dieses Grundgerüst kann auch durch die Addition weiterer Gruppen ergänzt werden. Zwei wichtig und bevorzugt Stilbene sind das 3,5-Dihydroxy-stilben (Pinosylvin) und das 3,4',5-Trihydroxy-stilben (Resveratrol).

Für Stilbensynthase kodierende DNA-Sequenzen sind beispielsweise aus den Europäischen Patentanmeldungen EP-A-0 309 862, EP-A-0 464 461 und EP-A-0 533 010 bekannt. In diesen Patentanmeldungen wird die Isolierung von Stilbensynthase-Genen und ihre Verwendung zur Erzeugung von transgenen Pflanzen, die eine erhöhte Schädlingsresistenz aufweisen, beschrieben. Die für Stilbensynthase kodierenden DNA-Sequenzen, die in diesen Patentanmeldungen beschrieben werden, werden bevorzugt erfindungsgemäß eingesetzt, wobei die für Resveratrolsynthase kodierenden Sequenzen besonders bevorzugt werden. Weiterhin werden bevorzugt die in den genannten Europäischen Patentanmeldungen beschriebenen, für Stilbensynthase kodierenden DNA-Sequenzen aus Erdnußpflanzen (*Arachis hypogaea* und aus Wein (*Vitis vinifera*)) eingesetzt. Die DNA-Sequenzen, die für Stilbensynthase kodieren, können in der Form vorliegen, wie sie in den entsprechenden natürlichen Pflanzengenen enthalten sind ("genomische Form"), einschließlich der gegebenenfalls vorhandenen nicht kodierenden Regionen (wie Introns) oder in einer Form, welche der cDNA ("copy DNA") entspricht, die über mRNA mit Hilfe von Reverse-Transkriptase/Polymerase erhältlich ist und keine Introns mehr enthält. Sie können auch in teilweise oder vollständig synthetisierter Form vorliegen oder aus Teilen verschiedener Herkunft zusammengesetzt vorliegen.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt werden die für Stilbensynthase kodierenden DNA-Sequenzen, welche in dem Plasmid pGS828.1 (EP-A-0 309 862), dem Plasmid pin5-49 (EP-A-0 533 010) und ganz besonders bevorzugt den Plasmiden pVst1, pVst2 und pVst12t3 (EP-A-0 464 461) enthalten sind sowie die mit Hilfe dieser DNA-Sequenzen (Verwendung als Sonden) aus Pflanzen isolierbaren weiteren für Stilbensynthase kodierende DNA-Sequenzen eingesetzt. Besonders hervorgehoben wird die für Stilbensynthase kodierende Sequenz, welche in dem Plasmid pVst1 (EP-A-0 464 461) enthalten ist.

Die Isolierung der als Bestandteil b) der DNA-Sequenz I verwendbaren DNA-Sequenzen ist bekannt und/oder kann nach den bekannten und dem Fachmann geläufigen Verfahren und Methoden erfolgen. Die kodierende Region für Stilbensynthase kann z. B. mit Hilfe der Polymerasekettenreaktions-Technik (PCR-Technik) aus den Plasmiden pVst1, pVst2, pVst12t3 oder pGS828.1 isoliert werden.

Die Amplifizierung kann mittels PCR, z. B. über folgende Programme erfolgen:

1x	95°C	180 sec.	
	72°C	hold (Zugabe der Polymerase)	30
25x	95°C	45 sec.	
	55°C	45 sec.	35
	72°C	90 sec.	
1x	95°C	45 sec.	40
	55°C	45 sec.	
	72°C	300 sec.	

Die Amplifizierung der Stilbensynthase-Gene Vst1 und Vst2 aus *Vitis vinifera* (var. *optima*) sowie des Stilbensynthase-Gens aus *Arachis hypogaea* (*A. hyp.*) kann mit den folgenden Primern durchgeführt werden:

Primer 1 Vst1: siehe SEQ ID NO: 1
 Primer 1 Vst2: siehe SEQ ID NO: 2
 Primer 1 A. hyp.: siehe SEQ ID NO: 3

Primer 2 Vst1: siehe SEQ ID NO: 4
 Primer 2 Vst2: siehe SEQ ID NO: 5
 Primer 2 A. hyp.: siehe SEQ ID NO: 6.

Alle so amplifizierten codierenden Regionen der einzelnen Gene können in die entsprechenden Restriktions-schnittstellen üblicher Vektoren einligiert werden.

Weiterhin können die kodierende und die terminierende Sequenz auch gemeinsam durch die Enzyme EcoRI und PstI sowie EcoRI und SphI aus pSSVst1 (vgl. unten) isoliert werden.

Die als Bestandteil c) in der DNA-Sequenz I enthaltene 3'-Polyadenylierungssequenz kann weitgehend variiert werden, so daß alle entsprechenden Sequenzen verwendet werden können, welche die Expression der Stilbensynthase in Pflanzen nicht nachteilig beeinflussen. Es kann auch zweckmäßig sein, mehrere (z. B. zwei) Polyadenylierungssequenzen, gegebenenfalls verschiedenen Ursprungs, hintereinander gefügt einzusetzen, insbesondere, wenn sich dies durch die jeweils verwendeten Techniken ergibt (vgl. Teil c) in SEQ ID NO: 7). Der Einfachheit halber wird vorzugsweise die in den natürlichen Stilbensynthase-Gen-enthaltene 3'-Polyadenylierungssequenz verwendet, wobei zweckmäßigerweise diese Sequenz zusammen mit der für Stilbensynthase kodierenden Sequenz aus den Stilbensynthase-Genen isoliert wird. Erfindungsgemäß können also als Bestand-

teile b) und c) auch Stilbensynthase-Gene eingesetzt werden, bei denen lediglich der natürliche Promotor entfernt wurde. In diesem Fall ist es nur erforderlich, den Bestandteil a) der DNA-Sequenz I, also den heterologen Promotor und gegebenenfalls den Enhancer, vorzuschalten.

Die Isolierung geeigneter 3'-Polyadenylierungssequenzen kann nach allgemein üblichen Verfahren und Methoden erfolgen, die dem Fachmann geläufig sind.

Ganz besonders bevorzugt werden als Komponenten a) bis c) der DNA-Sequenz I einzeln oder in der v liegender Kombination die DNA-Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 7 verwendet. In Seq ID NO: 7 stellen die Nukleotide 1 bis 720 den Doppel 35S CaMV RNA-Promotor dar, der aus dem CaMV 35S Enhancer und dem CaMV 35S Promotor besteht (Komponente a)). Die Nukleotide 721 bis 730 sind eine synthetische Linkersequenz. Die Nukleotide 731 bis 2265 der SEQ ID NO: 7 repräsentieren den kodierenden Teil für Stilbensynthase (Komponente b)) und die Nukleotide 2266 bis 2485 stellen den polyA-Teil (Komponente c)) des Stilbensynthase-Gens dar. Die Nukleotide von 2486 bis 2728 stellen den Anteil der Komponente c) aus CaMV 359 RNA dar, wobei am Ende Polylinkersequenzen vorliegen.

Der Begriff DNA-Sequenz I schließt auch alle abgeleiteten DNA-Sequenzen ein, welche noch die für die Ausführung der Erfindung wesentlichen Merkmale aufweisen, welche also in Pflanzen männliche Sterilität und gegebenenfalls eine Änderung der Blütenfarbe hervorrufen. In solchen abgeleiteten Sequenzen können einzelne DNAs, Kodons und/oder Teilsequenzen fehlen (z. B. durch die Verwendung von Restriktionsenzymen) und/oder durch andere DNAs, Kodons und/oder Teilsequenzen ersetzt sein. Solche Modifikationen können auf Grund der Degeneration des genetischen Kodes vorliegen, oder sich bei der Manipulation der DNA-Sequenzen ergeben. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und/oder ihre Bestandteile a) bis c) können auch DNAs und/oder DNA-Sequenzen enthalten, welche ihre Handhabung erleichtern, z. B. sogen. Linker oder welche von solchen Linkern nach Manipulationen (z. B. nach Schnitten mit Restriktionsenzymen) übrig bleiben. Die Bestandteile a) bis c) der DNA-Sequenz I können natürlichen Ursprungs sein oder teilweise oder vollständig in synthetisierter Form vorliegen.

Die Bestandteile a) bis c) können nach den allgemein üblichen und dem Fachmann geläufigen Verfahren und Methoden zu der DNA-Sequenz I, welche auch als ein "chimäres Gen" betrachtet werden kann, zusammengefügt werden.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung besteht die DNA-Sequenz I aus (a) dem sogenannten CaMV 35S-Doppelpromotor, der aus dem CaMV 35S Promotor und dem zugehörigen CaMV 35S Enhancer zusammengesetzt ist, und (b) der für Stilbensynthase (Resveratrolsynthase) kodierenden Sequenz mit der sich anschließenden 3'-Polyadenylierungssequenz, wie sie im Plasmid pVst1 (vgl. EP-A-0 464 461) vorliegt.

Diese DNA-Sequenz ist in dem neuen Plasmid pSSVst1 enthalten, dessen Konstruktion aus Fig. 1 ersichtlich ist. Die kodierende Region des Stilbensynthase-Gens Vst1 kann demgemäß als 2,1 kB-MunI-Fragment aus dem Plasmid pVst1 isoliert werden, das das vollständige Stilbensynthase-Gen (Vst1-Gen) als 4,9 kB-EcoRI-Fragment enthält. Allerdings fehlen diesem MunI-Fragment die ersten 4 Kodons am 5'-Ende des codierenden Bereichs. Das gereinigte MunI-Fragment wird zweckmäßigerweise mit dem Restriktionsenzym NruI nachverdaut und das entstandene 1,7 kB große NruI/MunI-Fragment mit einem Oligonukleotidlinker fusioniert, welcher für die ersten vier Aminosäuren kodiert. Da die überstehenden Enden der EcoRI- und MunI-Restriktionsschnittstellen identisch sind und eine MunI/EcoRI-Fusion verhindert werden soll, ist der Oligonukleotidlinker so konzipiert, daß die EcoRI-Schnittstelle erst durch einen nachträglichen Restriktionsverdau entsteht. Das entstandene NruI/EcoRI-Fragment wird zwischen die SmaI- und EcoRI-Schnittstellen des binären Vektors pSS ligiert, so daß die vollständige codierende Region des Stilbensynthase-Gens Vst1 unter der Kontrolle des doppelten 35S Promoters steht. Entsprechende andere Konstruktionen können durch den Fachmann anhand seines Fachwissens und der im vorliegenden Text enthaltenen Informationen mit Hilfe der üblichen Methoden hergestellt und verwendet werden.

Der Escherichia coli Stamm RH pSSVst1 enthält das Plasmid pSSVst1.

Dieser E. coli Stamm RH pSSVst1 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapest Vertrages über die internationale Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren am 18. Oktober 1994 hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer DSM 9501.

Das Plasmid pSSVst1 sowie der E. coli Stamm RH pSSVst1 und seine Mutanten, die noch die für die Ausführung der Erfindung wesentlichen Merkmale des hinterlegten Stammes aufweisen, sind ebenfalls Teil der vorliegenden Erfindung.

Der E. coli Stamm RH pSSVst1 kann nach den allgemein üblichen Methoden vermehrt werden. Das Plasmid pSSVst1 kann ebenfalls nach den allgemein üblichen Methoden aus diesem E. coli Stamm gewonnen werden. Ebenso ist es dem Fachmann leicht möglich, die in dem Plasmid pSSVst1 enthaltene DNA-Sequenz I zu isolieren. So kann z. B. die im Plasmid pSSVst1 enthaltene DNA-Sequenz I, aus diesem Plasmid mit Hilfe der Restriktionsenzyme SphI und PstI in Form eines etwa 2700 bp (Basenpaare) großen DNA-Fragments isoliert werden.

Mit Hilfe der üblichen und dem Fachmann geläufigen Methoden ist es möglich, die DNA-Sequenz I ein oder mehrfach (z. B. Tandemanordnung), vorzugsweise einfach, in beliebige prokaryontische (vorzugsweise bakterielle) oder eukaryontische (vorzugsweise pflanzliche) DNA als "fremde" DNA einzubauen. Die so "modifizierte" rekombinante DNA, welche z. B. zur Transformation von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen verwendet werden kann und nach der Transformation in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen enthalten ist, ist Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

Die DNA-Sequenz I sowie die rekombinante DNA können als "fremde" DNA in Vektoren (insbesondere Plasmiden, Cosmiden oder Phagen), in transformierten Mikroorganismen (vorzugsweise Bakterien, insbesondere Gram-negativen Bakterien, wie E. coli) sowie in transformierten Pflanzenzellen und Pflanzen bzw. in deren DNA enthalten sein. Solche Vektoren, transformierte Mikroorganismen (die auch diese Vektoren enthalten

können) sowie die transformierten Pflanzenzellen und Pflanzen und deren DNA stellen Bestandteile der vorliegenden Erfindung dar.

Wie bereits angedeutet, werden erfundungsgemäß die DNA-Sequenz I ein- oder mehrfach (an gleichen oder verschiedenen Stellen des Genoms) in das natürliche pflanzliche Genom eingebaut.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) und Pflanzen (einschließlich Pflanzenteile und Samen), wobei diese Pflanzen männlich steril sind und gegebenenfalls eine geänderte Blütenfarbe aufweisen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (a) ein oder mehrfach die DNA-Sequenz I und/oder erfundungsgemäß rekombinante DNA in das Genom von Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) einsetzt und gegebenenfalls
- (b) aus den transformierten Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) vollständige transformierte Pflanzen regeneriert und gegebenenfalls vermehrt und gegebenenfalls
- (c) von den so erhaltenen transgenen Pflanzen der Elterngeneration oder weiterer daraus gewonnener Generationen die gewünschten Pflanzenteile (einschließlich Samen) gewinnt.

Die Verfahrensschritte (a), (b) und (c) können nach bekannten Verfahren und Methoden in üblicher Weise durchgeführt werden.

Transgene Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) und Pflanzen (einschließlich Pflanzenteile und Samen), welche ein oder mehrfach die DNA-Sequenz I als "fremde" DNA enthalten und deren Nachkommen sowie solche transformierte Pflanzenzellen und Pflanzen, welche nach den obigen Verfahren erhältlich sind und deren Nachkommen, gehören ebenfalls zur vorliegenden Erfindung.

Teile der vorliegenden Erfindung sind auch die:

- (a) Verwendung der DNA-Sequenz I und/oder der erfundungsgemäß rekombinanten DNA und/oder der erfundungsgemäß rekombinanten Vektoren und/oder der erfundungsgemäß transformierten Mikroorganismen zur Transformation von Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) und Pflanzen (einschließlich Pflanzenteilen und Samen), die
- (b) Verwendung der erfundungsgemäß transgenen Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) und Pflanzen (einschließlich Pflanzenteilen und Samen) zur Erzeugung von Vermehrungsmaterial sowie zur Erzeugung neuer Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, die
- (c) Verwendung der erfundungsgemäß DNA-Sequenz I und/oder der erfundungsgemäß rekombinanten DNA zur Erzeugung von männlicher Sterilität und gegebenenfalls einer geänderten Blütenfarbe in Pflanzen, die
- d) Verwendung der auf dem Plasmid pSSVst1 enthaltenen DNA-Sequenz I zum Nachweis der Anwesenheit der DNA-Sequenz I in Pflanzen sowie (allgemein) bei der Erzeugung von transgenen Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) und Pflanzen (einschließlich Pflanzenteilen und Samen) sowie die
- e) Verwendung der für Stilbensynthase kodierenden DNA-Sequenz zur Erzeugung von transgenen Pflanzen, welche männlich steril sind und/oder gegenüber entsprechenden Pflanzen, die diese DNA in ihrem Genom nicht enthalten, eine geänderte Blütenfarbe aufweisen.

Eine Anzahl verschiedener Methoden steht zur Verfügung, die DNA-Sequenz I als "fremde" DNA in das genetische Material von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einzusetzen. Der Gentransfer kann nach den allgemein üblichen bekannten Methoden erfolgen, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann.

Das Ti-Plasmid von Agrobacterium tumefaciens steht als besonders günstiger und breit einsetzbarer Vektor zur Übertragung von fremder DNA in Genome dikotyler und monokotyler Pflanzen zur Verfügung. Hierzu wird die DNA-Sequenz I in geeigneter Weise in die T-DNA von geeigneten Ti-Plasmiden eingesetzt (z. B. Zambryski et al., 1983) und durch Infektion der Pflanze, Infektion von Pflanzenteilen oder Pflanzengeweben, wie z. B. von Blattscheiben, Stengeln, Hypokotylen, Kotyledonen, Meristemen und davon ableitenden Geweben, wie z. B. sekundären Embryonen und Kallus oder durch Kokultur von Protoplasten mit Agrobacterium tumefaciens übertragen.

Eine Alternative ist die Inkubation der DNA-Sequenz I oder von rekombinanter DNA mit Pflanzenprotoplasten (z. B. Hain et al., 1985; Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984) in Gegenwart von Polykationen oder Calciumsalzen und Polyethylenglykol.

Die DNA-Aufnahme kann auch zusätzlich durch ein elektrisches Feld (Elektroporation) begünstigt werden (z. B. Fromm et al., 1986).

Die DNA kann in bekannter Weise auch über Pflanzenpollen eingeführt werden, z. B. indem Pollen oder Pflanzengewebe mit physikalisch beschleunigten Partikeln "beschossen" werden, welche die DNA tragen (vgl. EP-A 0 270 356).

Die Regeneration der Pflanzen erfolgt in bekannter Weise mit Hilfe geeigneter Nährmedien (z. B. Nagy und Maliga 1976).

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäß Verfahrens (gemäß der Methode aus EP-A 116 718) wird die DNA-Sequenz I, wie sie auf dem Plasmid pSSVst1 enthalten ist, in einen geeigneten intermediaeren E.coli Vektor z. B. pGV700 oder pGV710, (vergl. EP-A-116 718) bzw. vorzugsweise Derivaten davon, die zusätzlich ein Reportergen wie z. B. nptII (Herrera-Estrella et al. 1983) oder hpt (Van den Elzen et al. 1986) enthalten, kloniert.

Das so konstruierte Plasmid wird auf Agrobacterium tumefaciens, das z. B. pGV 3850 bzw. Derivate davon

enthält (Zambryski et al. 1983), mit üblichen Methoden (z. B. Van Haute et al. 1983) übertragen. Alternativ dazu kann die DNA-Sequenz I in einem binären Vektor, z. B. PCV001 oder PCV002 (z. B. Koncz und Schell 1986) kloniert und wie oben beschrieben in einen geeigneten Agrobakterium Stamm (Koncz und Schell 1986) transferiert werden. Der resultierende Agrobakterium Stamm, der die DNA-Sequenz I in einer auf Pflanzen transferierbaren Form enthält, wird im weiteren zur Pflanzentransformation verwendet. Das Plasmid pSSVst1 kann auch direkt in einen geeigneten *A. tumefaciens* Stamm (vgl. z. B. Koncz und Schell (1986)) eingebracht werden.

In einer weiteren b v r zugten Ausführungsform wird das Plasmid pSSVst1, das ein Reportergen für Pflanzenzellen für Kanamycin-Resistenz (z. B. Herrera-Estrella et al. 1983) enthält, in üblicher Weise durch direkten Gentransfer auf Pflanzenprotoplasten übertragen (z. B. Hain et al. 1985). Dabei kann das Plasmid pSSVst1 in zirkulärer, vorzugsweise jedoch in linearer Form, vorliegen. Bei der Verwendung von pSSVst1 mit Reportergen werden kanamycinresistente Protoplasten dann auf Expression von Stilbensynthasen überprüft.

Transformierte (transgene) Pflanzen bzw. Pflanzenzellen werden nach den bekannten Methoden, z. B. durch Blattscheiben Transformation (z. B. Horsch et al. 1985) durch Cokultur regenerierender Pflanzenprotoplasten oder Zellkulturen mit *Agrobacterium tumefaciens* (z. B. Marton et al. 1979, Hain et al. 1985) oder durch direkte DNA Transfektion erzeugt. Resultierende transformierte Pflanzen werden entweder durch Selektion auf die Expression des Reportergens, z. B. durch Phosphorylierung von Kanamycin-Sulfat in vitro (Reiss et al. 1984; Schreier et al. 1985) oder durch die Expression der Nopalinsynthase (nach Aerts et al. 1983) oder Stilbensynthase durch Northern-Blot-Analyse und Western Blot-Analyse nachgewiesen. Die Stilbensynthase und die Stilbene können auch in bekannter Weise mit Hilfe spezifischer Antikörper in transformierten Pflanzen nachgewiesen werden. Stilbensynthase kann auch durch Enzymaktivitätstest nachgewiesen werden (Röls et al., Plant Cell Reports 1, 83–85, 1981).

Die Kultivierung der transformierten Pflanzenzellen sowie die Regeneration zu vollständigen Pflanzen erfolgt nach den allgemein üblichen Methoden mit Hilfe der jeweils geeigneten Nährmedien.

Sowohl die transformierten Pflanzenzellen als auch die transformierten Pflanzen, welche die erfundungsgemäße DNA-Sequenz I enthalten und welche Bestandteile der vorliegenden Erfindung sind, zeigen eine erheblich höhere Resistenz gegen Schädlinge, insbesondere pflanzenpathogene Pilze.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck "Pflanzen" sowohl vollständige Pflanzen als auch Pflanzenteile, wie Blätter, Stengel oder Wurzeln sowie Vermehrungsmaterial, wie Samen, Knollen, Stecklinge usw. "Pflanzenzellen" schließen Protoplasten, Zelllinien, Pflanzenkallus usw. ein.

Wie bereits dargelegt wurde, weisen Pflanzen, welche die erfundungsgemäße DNA-Sequenz I in ihrem Genom enthalten, eine männliche Sterilität und gegebenenfalls eine, im Vergleich zu den entsprechenden Pflanzen, welche die DNA-Sequenz I nicht enthalten, geänderte Blütenfarbe auf.

Bei Zierpflanzen und Schnittblumen, z. B. Rosen, Nelken, Freesien, Gerbera usw., ist die Blütenfarbe von einer erheblichen kommerziellen Bedeutung. Häufig ist die gezielte Beeinflussung der Blütenfarben und die Erzielung stabiler Blütenfarben schwierig und aufwendig. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es auf relativ einfache Weise die Blütenfarbe aller bunt blühenden Pflanzen, die Blütenfarben, insbesondere Anthocyane, aufweisen, zu ändern. In der Regel werden durch den Einbau der DNA-Sequenz I die Blüten heller und häufig ganz weiß. Bei Pflanzen ohne bunte Blüten, ist im allgemeinen eine Veränderung nicht oder nur schwer zu erkennen.

Die männliche Sterilität von Pflanzen spielt in der Pflanzenzucht bei der Erzeugung von Hybridlinien und Hybridsamen eine sehr große Rolle. Leider sind viele Hybridlinien sehr empfindlich gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen, so daß hierdurch ihre Verwendbarkeit sehr stark eingeschränkt ist. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es auf relativ einfache Weise möglich, männlich sterile Pflanzen zu erzeugen. Diese Pflanzen weisen zudem eine erhöhte Resistenz gegenüber mikrobiellen Pflanzenschädlingen, wie phytopathogenen Pilzen, Bakterien und/oder Viren, insbesondere gegenüber phytopathogenen Pilzen auf und sind somit nach anderen Verfahren gewonnenen männlich sterilen Pflanzen überlegen.

Zu den Pflanzen, welchen durch den Einbau (Transformation) der erfundungsgemäßen DNA-Sequenz I eine männliche Sterilität verliehen werden kann, gehören praktisch alle Pflanzen. Ein besonderes diesbezüglichen Bedürfnis besteht naturgemäß bei den Kulturpflanzen, wie Nahrungsmittel und Rohstoffe liefernden Pflanzen, z. B. Getreide (insbesondere Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Hirse, Reis und Mais), Kartoffel, Leguminosen (wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohnen), Gemüse (insbesondere Kohlarten und Tomaten), Obst (insbesondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal und Baumwolle sowie bei Heilpflanzen wie Rauwolfia und Digitalis. Besonders bevorzugt seien Reis, Weizen, Gerste, Roggen, Mais, Zuckerrübe, Raps und Soja genannt.

Die vorliegende Erfindung soll anhand der folgenden beispielhaften Ausführungen näher erläutert werden:

55 I) Transformation von Pflanzen

1. Konstruktion und Beschreibung des Vektors pSSVst1

60 Die Konstruktion des Plasmids pSSVst1 wurde bereits oben näher erläutert und ist in Fig. 1 dargestellt, so daß sie ohne weiteres durch den Fachmann nachvollzogen werden kann.

Das Plasmid pSSVst1 ist ein Derivat von pSS. pSS stellt ein Derivat von PCV001 (Koncz und Schell, 1986) dar, welches eine Expressionskassette, basierend auf dem Plasmid pRT101 (Töpfer et al., 1987) enthält, in der eine Verdoppelung des CaMV 35S RNA Enhancers durch Einklonierung des DdeI/EcoRV-Fragments in die HinclI Schnittstelle durchgeführt wurde. pSSVst1 enthält die kodierende Sequenz sowie die polyA-Sequenz von Stilbensynthase aus pVst1 (vgl. Fig. 1). pSSVst1 enthält eine Kanamycinresistenz für Pflanzen und eine bakterielle Ampicillinresistenz. Weiterhin enthält pSSVst1 Bordersequenzen aus dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* sowie einen Replikationsstart für *A. tumefaciens* und *E. coli* (Koncz und Schell, 1986). Das Plasmid

pSSVst1 kann mit Hilfe des Stammes *E. coli* RH pSSVst1 direkt in einen geeigneten Agrobakterium tumefaciens Stamm (z. B. Koncz und Schell, 1986) mobilisiert werden.

2. Transformation von Tabak

a) Kultur von Tabaksprossen und Isolierung von Tabakprotoplasten

Nicotiana tabacum (Petit Havana SR1) wird als sterile Sproßkultur auf hormonfreiem LS Medium (Linsmaier und Skoog 1965) vermehrt. In Abständen von ca. 6–8 Wochen werden Sproßabschnitte auf frisches LS-Medium umgesetzt. Die Sproßkulturen werden bei 12 h Licht (1000–3000 Lux) in einem Kulturraum bei 24–26°C gehalten.

Für die Isolierung von Blattprotoplasten werden ca. 2 g Blätter (ca. 3–5 cm lang) mit einer frischen Rasierklinge in kleine Stücke (0,5 cm × 1 cm) geschnitten. Das Blattmaterial wird in 20 ml Enzymlösung, bestehend aus K3 Medium (Nagy und Maliga 1976), 0,4 M Saccharose, pH 5,6, 2% Zellulase R10 (Serva), 0,5% Macerozym R10 (Serva) für 14–16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Protoplasten durch Filtration über 0,30 mm und 0,1 mm Stahlsiebe von Zellresten getrennt. Das Filtrat wird 10 Minuten lang bei 100 × g zentrifugiert. Während dieser Zentrifugation flotieren intakte Protoplasten und sammeln sich in einer Bande am oberen Rand der Enzymlösung. Das Pellet aus Zellresten und die Enzymlösung werden mit einer Glaskapillare abgesaugt. Die vorgereinigten Protoplasten werden mit frischem K3 Medium (0,4 M Saccharose als Osmotikum) auf 10 ml aufgefüllt und erneut flotiert. Das Waschmedium wird abgesaugt und die Protoplasten werden für Kultur oder folgende Infektion mit Agrobakterien (Kokultur) auf 1–2 × 10⁵/ml verdünnt. Die Protoplastenkonzentration wird in einer Zählkammer bestimmt.

b) Transformation von regenerierenden Tabakprotoplasten durch Kokultur mit Agrobacterium tumefaciens

Es wird im folgenden die Methode von Marton et al. 1979 mit kleinen Veränderungen benutzt. Die Protoplasten werden wie beschrieben isoliert und in einer Dichte von 1–2 × 10⁵/ml in K3 Medium (0,4 M Saccharose, 0,1 mg/l NAA, 0,2 ml in K3 Medium (0,4 M Saccharose, 0,1 mg/l NAA, 0,2 mg Kinetin) 2 Tage im Dunkeln und ein bis zwei Tage lang unter Schwachlicht (500 lux) bei 26°C inkubiert. Sobald die ersten Teilungen der Protoplasten auftreten, werden 30 µl einer Agrobakteriumsuspension, die die Sequenz I in ihrer T-DNA enthalten oder die das Plasmid pSSVst1 enthalten, in minimal A (Am) Medium (Dichte ca. 10⁹ Agrobakterien/ml) zu 3 ml regenerierenden Protoplasten gegeben. Die Kokulturdauer beträgt 3–4 Tage bei 20°C im Dunkeln. Danach werden die Tabakzellen in 12 ml Zentrifugenröhren gefüllt, mit Seewasser (600 mOsm/kg) auf 10 ml verdünnt und bei 60 × g 10 Minuten lang pelletiert. Dieser Waschvorgang wird noch 1–2 × wiederholt um den größten Teil der Agrobakterien zu entfernen. Die Zellsuspension wird in einer Dichte von 5 × 10⁴/ml in K3 Medium (0,3 M Saccharose) mit 1 mg/l NAA (Naphthyl-1-essigsäure), 0,2 mg/l Kinetin und 500 mg/l des Cephalosporin-Antibiotikums Cefotaxim kultiviert. Die Zellsuspension wird jede Woche mit frischem K3 Medium verdünnt und der osmotische Wert des Mediums graduell um 0,05 M Saccharose (ca. 60 mOsm/kg) pro Woche reduziert. Die Selektion mit Kanamycin (100 mg/l Kanamycinsulfat (Sigma), 660 mg/g aktives Km) wird 2–3 Wochen nach der Kokultur in Agarose "bead type culture" (Shillito et al. 1983) gestartet. Kanamycinresistente Kolonien können 3–4 Wochen nach Beginn der Selektion vom Hintergrund zurückgebliebener Kolonien unterschieden werden.

c) Direkte Transformation von Tabakprotoplasten mit DNA. Calciumnitrat-PEG Transformation

In einer Petrischale werden ca. 10⁶ Protoplasten in 180 µl K3 Medium mit 20 µl wässriger DNA Lösung welche 0,5 µg/µl Plasmid pSSVst1 oder die isolierte DNA-Sequenz I aus pSSVst1 als DNA-Fragment und 0,5 µl/µl pLGVneo2103 (Hain et al. 1985) enthält, vorsichtig gemischt. Anschließend werden 200 µl Fusionslösung (0,1 M Calciumnitrat, 0,45 M Mannit, 25% Polyethylenglykol (PEG 6000), pH 9) vorsichtig zugegeben. Nach 15 Minuten werden 5 ml Waschlösung (0,275 M Calciumnitrat pH 6) addiert und nach weiteren 5 Minuten werden die Protoplasten in ein Zentrifugenröhren transferiert und bei 60 × g pelletiert. Das Pellet wird in einer kleinen Menge K3 Medium aufgenommen und wie im nächsten Abschnitt beschrieben kultiviert. Alternativ können die Protoplasten nach Hain et al. 1985 transformiert werden.

Die Transformation mit der DNA-Sequenz I aus pSSVst1 kann auch ohne den Zusatz der 0,5 µg/µl pLGV neo 2103 durchgeführt werden. Da in diesem Fall kein Reportergen eingesetzt wird, werden die resultierenden Kallus auf das Vorhandensein der DNA-Sequenz-I-Gen-Einheit mit Hilfe einer Dot-Blot-Hybridisierung überprüft. Als Hybridisierung-Probe ist die kodierende Sequenz aus pSSVst1 verwendbar. Selbstverständlich können auch andere Nachweismethoden, wie Test mit Antikörpern oder ein Enzymtest für Stilbensynthase eingesetzt werden.

d) Kultur der mit DNA inkubierten Protoplasten und Selektion Kanamycin resistenter Kallus

Für die im folgenden beschriebenen Kultur und Selektion Kanamycin resistenter Kolonien wird eine modifizierte "Bead Type culture"-Technik (Shillito et al. 1983) verwendet. Eine Woche nach Behandlung der Protoplasten mit DNA (vgl. c) werden 3 ml der Zellsuspension mit 3 ml K3 Medium (0,3 M Saccharose + Hormone; 1,2% (Seaplaque) LMT Agarose (low melting agarose, Marine Colloids) in 5 cm Petrischalen gemischt. Für diesen Zweck wird Agarose trocken autoklaviert und nach Zugabe von K3 Medium im Mikrowellenherd kurz aufgekocht. Nach Erstarren der Agarose werden die Agarosescheiben ("beads") mit den eingebetteten Tabakmikrokalli für weitere Kultur und Selektion in 10 cm Petrischalen transferiert und je 10 ml K3 Medium (0,3 M

Saccharose, 1 mg/l NAA, 0,2 mg/l Kinetin) und 100 mg/l Kanamycinsulfat (Sigma) addiert. Das Flüssigmedium wird jede Woche gewechselt. Dabei wird der osmotische Wert des Mediums stufenweise herabgesetzt.
Pro Woche wird das Austauschmedium (K3 + Km) um 0,05 m an Saccharose (ca. 60 mOsm) reduziert.

5 Schema der Selektion kanamycinresistenter Tabakkolonien nach DNA Transformation

	0,4 M	0,3 M	0,25 M	0,20 M	0,15 M	0,10 M	Saccharose im Flüssigmedium
10	A	ES				K	
15		1	2	3	4	5	6 Wochen nach DNA Aufnahme
20							

(K3 Medium 1 mg NAA, 0,2 mg Kinetin)

25 A = DNA Aufnahme

E = Einbettung in Agarose

S = Selektion mit Kanamycin (100 mg/l Kanamycinsulfat)

30 K = Kanamycinresistente Kolonien können vom Hintergrund eindeutig unterschieden werden

35 e) Regeneration kanamycinrestistenter Pflanzen

40 Sobald die kanamycinrestistenteren Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 cm erreicht haben, wird die Hälfte auf Regenerationsmedium (LS-Medium, 2% Saccharose, 0,5 mg/l Benzylaminopurin BAP) gesetzt und bei 12 h Licht (3000–5000 lux) und 24°C im Kulturräum gehalten. Die andere Hälfte wird als Kalluskultur auf LS Medium mit 1 mg/l NAA, 0,2 mg/l Kinetin, 0,1 mg/l BAP und 100 mg/l Kanamycinsulfat propagiert. Wenn die regenerierten Sprosse ca. 1 cm groß sind, werden sie abgeschnitten und auf 1/2 LS Medium (1% Saccharose, 0,8% Agar) ohne Wachstumsregulatoren zur Bewurzelung gesetzt. Die Sprosse werden auf 1/2 MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycinsulfat bewurzelt und später in Erde umgesetzt.

45 f) Transformation von Blattscheiben durch Agrobacterium tumefaciens

50 Für die Transformation von Blattscheiben (Horsch et al. 1985) werden ca. 2–3 cm lange Blätter von sterilen Sproßkulturen in Scheiben von 1 cm Durchmesser gestanzt und mit einer Suspension entsprechender Agrobakterien, die das Plasmid pSSVst1 oder die DNA-Sequenz I aus diesem Plasmid in ihrer T-DNA enthalten, (ca. 10⁹/ml) (vgl. b), in Am-Medium, (siehe unten) für ca. 5 Minuten inkubiert. Die infizierten Blattstücke werden auf MS-Medium (siehe unten) ohne Hormone für 3–4 Tage bei ca. 24°C gehalten. Während dieser Zeit überwächst Agrobakterium die Blattstücke. Die Blattstücke werden anschließend in MS-Medium (0,5 mg/ml BAP, 0,1 mg/ml NAA) gewaschen und auf das gleiche Medium (0,8% Agar) mit 500 g/ml Cefotaxim und 100 g/ml Kanamycinsulfat (Sigma) gelegt. Nach zwei Wochen sollte das Medium erneuert werden. Transformierte Sprosse werden nach weiteren 2–3 Wochen sichtbar.

55 Biochemische Nachweismethode der Transformation

Neomycin-Phosphotransferase (NPT II) Enzymtest

60 NPT II Aktivität in Pflanzengewebe wird durch *in situ* Phosphorylierung von Kanamycin, wie bei Reiß et al. (1984) beschrieben und von Schreier et al. (1985) modifiziert, wie folgt, nachgewiesen. 50 µg Pflanzengewebe werden in 50 µl Extraktionspuffer (10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoethanol, 0,1% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris pH 6,8) unter Zusatz von Glaspulver auf Eis homogenisiert und 10 Minuten lang in einer Eppendorfzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. 50 µl des Überstandes werden auf ein natives Polyacrylamidgel (145 × 110 × 1,2 mm; Trenngel: 10% Acrylamid, 0,33% Bisacrylamid, 0,375 M Tris pH 8,8, Sammelgel: 5% Acrylamid, 0,165% Bisacrylamid, 0,125 M Tris pH 6,8) aufgetragen und über Nacht bei 4°C und 60 V elektrophoretisiert. Sobald der Bromphenolblau-Marker aus dem Gel herausläuft, wird das Gel zweimal mit destilliertem Wasser 10 Min. lang und einmal 30 Min. mit Reaktionspuffer gewaschen (67 mM Tris-Maleat, pH 7,1, 42 mM MgCl₂, 400

mM Ammoniumchlorid). Das Gel wird auf eine gleichgroße Glasplatte gelegt und mit 40 ml 1%iger Agarose in Reaktionspuffer, der die Substrate Kanamycinsulfat (20 g/ml) und 20–200 Ci ^{32}P ATP (Amersham) enthält, überschichtet. Das Sandwichgel wird 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert und dann wird ein Blatt Phosphozellulosepapier P81 (Whatman) auf die Agarose gelegt. Darüber werden vier Filtrerpapierlagen 3 MM, (Whatman) und einige Papierhandtücher gestapelt. Der Transfer von *in situ* phosphoryliertem radioaktiven Kanamycinphosphat auf das P81 Papier wird nach 3–4 h gestoppt. Das P81 Papier wird für 30 min. in einer Lösung von Proteinase K und 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) bei 60°C inkubiert und dann 3–4 mal in 250 ml 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5 bei 80°C gewaschen, getrocknet und für 1–12 h lang bei –70°C autoradiografiert (XAR5 Film Kodak).

In den gemäß den obigen Beispielen erhaltenen Pflanzenzellen und Pflanzen (Tabak) wurde die Anwesenheit der für Stilbensynthase kodierenden DNA-Sequenz durch Southern Blot Analyse bestätigt. Die Expression der für Stilbensynthase kodierenden Sequenz wurde durch Northern Blot Analyse, Stilbensynthase und Resveratrol mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Transformierte und nichttransformierte Pflanzen (zum Vergleich) wurden im Gewächshaus bis zur Blüte kultiviert. Die transformierten Pflanzen zeigten (gegenüber den nicht transformierten Vergleichspflanzen) eine veränderte Blütenfarbe und waren männlich steril.

Die bei der Transformation von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen eingesetzte Medien werden u. a. in der EP-A 0 309 862 beschrieben:

Alle Prozentangaben in den obigen sowie in den nachfolgenden Beispielen beziehen sich auf Gewichtsprozent, wo nichts anderes angegeben wird.

II) Prüfung der transgenen Pflanzen auf eine veränderte Blütenfarbe sowie die männliche Sterilität

Beispiel A

Die gemäß den obigen Beispielen erhaltenen transgenen Tabakpflanzen werden in Gewebekultur vorgezogen und anschließend im Gewächshaus bei 23°C und 70–80% relat. Luftfeuchte bis zur Blüte herangezogen. Die Versorgung mit Dünger und Wasser erfolgt nach Bedarf.

Alle gemäß Beispiel I) transformierten Pflanzen zeigten eine weiße oder weiß-rosa Blütenfarbe die auch nach Rückkreuzung mit dem Wildtyp in der F1-Generation erhalten blieb, während die nicht transformierten entsprechenden Kontrollpflanzen eine kräftig rote, dunkelrosa oder purpurfarbene Blütenfarbe aufwiesen.

Ebenso waren alle transformierten Pflanzen männlich steril, wobei diese Sterilität auch in der F1-Generation erhalten blieb.

Zur Transformation von Pflanzen können die folgenden Veröffentlichungen herangezogen werden:
Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Fallupi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803–4807

Fromm ME, Taylor LP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319: 791–793

Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A.P., Steinbüß, H.H., Herrera-Estrella, L., Schell, J. (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. Molec Gen Genet 199: 161–168

Hain R., Bieseler B., Kindl H., Schröder G., Stöcker R. (1990) Expression of a stilbene synthase gene in Nicotiana tabacum results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Mol. Biol. 15: 325–336

Hain R., Reif H.J., Krause E., Langbartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schnetzer E., Schreier P.H., Stöcker R.H., Stenzel K. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novice plant. Nature 361: 153–156

Hernalsteens JP, Thia-Tong L, Schell J, Van Montagu M (1984) An Agrobacterium-transformed Cell culture from the monocot Asparagus officinalis. EMBO J 3: 3039–3041

Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, van Montagu M, Schell J. (1983) EMBO J. 2: 987–995

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science 277: 1229–1231

Krens FH, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296: 72–74

Koncz C, Schell J (1986) The promotor of T-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium linary vector. Mol. Gen. Genet. (1986) 204: 338–396

Linsmaier DM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18: 100–127

Marton L, Wullems GJ, Molendijk L, Schilperoort PR (1979) In vitro transformation of cultured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. Nature 277: 1229–131

Melchior F, Kindl H (1990) Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in Escherichia coli into a catalytically active enzyme FEBS 268: 17–20

Nagy JI, Maliga P (1976) Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of Nicotiana sylvestris. Z Pflanzenphysiol 78: 453–455

Otten LABM, Schilperoort RA (1978) A rapid microscale method for the detection of Lysopin and Nopalatin dehydrogenase activities. Biochim biophys acta 527: 497–500

Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandak V, Hohn T, Hohn B, Potrykus I (1984) Direct gene transfer to plants. EMBO J 3: 2717–2722

R If, C.H., Fritzemeier K.H. and Kindl H. (1981) Cultured cells of *Arachis hypogaea* susceptible to induction of stilbene synthase (resveratrol forming) Plant Cell Rep. 1: 83—85
 Schröder, G., Brown J.W.S. and Schröder, J. (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcon synthase. Eur. J. Biochem. 172, 161—169
 5 Shillito RD, Paszkowski J, Potrykus I (1983) Agarose plating and Bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. Pl Cell Rep 2: 244—247 Van den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JR (1985) A chimaeric resistance gene as a selectable marker in plant cells. Plant Mol. Biol. 5, 299—302
 10 Van den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JR (1985) A chimaeric resistance gene as a selectable marker in plant cells. Plant Mol. Biol. 5, 299—302
 Velten J, Velten L, Hain R, Schell J (1984) Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J 12: 2723—2730
 15 Van Haute E, Joos H, Maes M, Warren G, Van Montagu M, Schell J (1983) Intergenic transfer and exchange recombination of restriction fragments clones in pBR 322: a novel strategy for the reversed genetics of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J 2: 411—418
 Zambryski P, Joos H, Genetello C, van Montagu M, Schell J (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without altering their normal regeneration capacity, EMBO J 12: 2143—2150
 Reiss, B., Sprengel, Will H., and Schaller H(1984) A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts, GENE 1081: 211—217
 20 Schreier P.H., Seftor EA, Schell J. and Bohnert H.J. (1985) The use of nucleic acid sequences to direct the light-regulated synthesis and transport of a foreign protein into plant chloroplasts, EMBO J Vol. 4, No. 1: 25—32.

Weiterhin können die folgenden veröffentlichten Patentanmeldungen aufgeführt werden:

25 EP-A 116 718 EP-A-126 546
 EP-A 159 418 EP-A-164 597
 EP-A 120 515 EP-A-175 966
 EP-A-120 516 WO 84/02913
 EP-A-172 112 WO 84/02919
 30 EP-A-140 556 WO 84/02920
 EP-A-174 166 WO 83/01176
 EP-A-122 791
 EP-A-0 309 862
 EP-A-0 464 461
 35 EP-A-0 533 010

40

45

50

55

60

65

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bayer AG
- (B) STRASSE: Bayerwerk
- (C) ORT: Leverkusen
- (D) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-51368
- (G) TELEPHON: 0214/30 66400
- (H) TELEFAX: 0214/30 3482
- (I) TELEX: 85 101-265 by d

10

15

20

(ii) ANMELDETITEL: DNA-Sequenzen und ihre Verwendung

25

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

30

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

40

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

50

55

60

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TCCCCCGGGA TCCATGGCTT CAATTGAGGA AAT

33

15 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

20 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

30 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

40 TCCCCCGGGA TCCATGGCGT CTGTGGAGGA AAT

33

45 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

45 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

60

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

10

TCCCCCGGGA TCCATGGTGT CTGTGAGTGG AAT

33

15

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

20

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

30

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGAATTCCCG GGTCAATTTG TAACCATAGG AA

32 40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

45

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

50

55

60

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CGGATCCCGG GTCAATTGGA ATCCCTAGGA A

31

15 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

20 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

30 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

40 CGGATCCCGG GTCTTCGCAT AACGAATTAA CT

32

45 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

50 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2728 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

60

65

DE 44 40 200 A1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

10

AAGCTTGCAT GCCTGCAGGT CTCAGAAGAC CAGAGGGCTA TTGAGACTTT TCAACAAAGG

60

15

GTAATATCGG GAAACCTCCT CGGATTCCAT TGCCCAGCTA TCTGTCACCT CATCGAAAGG

120

ACAGTAGAAA AGGAAGATGG CTTCTACAAA TGCCATCATT GCGATAAAGG AAAGGCTATC

180

20

GTTCAAGAAC GCCTCTACCG ACAGTGGTCC CAAAGATGGA CCCCCACCCA CGAGGAACAT

240

25

CGTGGAAAAAA GAAGACGTTTC CAACCACGTC TTCAAAGCAA GTGGATTGAT GTGATAACAT

300

GGTGGAGCAC GACACTCTCG TCTACTCCAA GAATATCAAA GATACAGTCT CAGAAGACCA

360

30

GAGGGCTATT GAGACTTTTC AACAAAGGGT AATATCGGGA AACCTCCTCG GATTCCATTG

420

CCCAGCTATC TGTCACTTCA TCGAAAGGAC AGTAGAAAAG GAAGATGGCT TCTACAAATG

480

35

CCATCATTGC GATAAAGGAA AGGCTATCGT TCAAGAATGC CTCTACCGAC AGTGGTCCCA

540

AAGATGGACC CCCACCCACG AGGAACATCG TGGAAAAGA AGACGTTCCA ACCACGTCTT

600

40

CAAAGCAAGT GGATTGATGT GATATCTCCA CTGACGTAAG GGATGACGCA CAATCCCAC

660

45

ATCCTTCGCA AGACCCGTCC TCTATATAAG GAAGTTCATT TCATTGGAG AGGACCTCGA

720

GAATTCCACC ATGGCTTCAA TTGAGGAAAT TAGAAACGCT CAACGTGCCA AGGGTCCGGC

780

50

CACCATCCTA GCCATTGGCA CAGCTACTCC CGACCACTGT GTCTACCAAGT CTGATTATGC

840

55

60

65

DE 44 40 200 A1

	TGATTACTAT TTCAGAGTCA CTAAGAGCGA GCACATGACT GAGTTGAAGA AGAAGTTCAA	900
5	TCGCATATGT AAGTATATAT ATTCATGCAT TAATTCTTAC ATTACAACA TTTCTATAACA	960
	TATACGAGTG TGCTATTAAG TGAGGGTCAC CTCCAAGTGA ATGAATGTTT CAAGCTTAGA	1020
10	GAATAGCTTT TAGCTAAATT ACTTTAGGAA ACTTGAAAAT CATTACAT CAGTAACCGA	1080
	TATTCCTTTC ATTTGATTGT AAGGGCTTGA AGAGCTGTT TC TTGAATCAT GTAGCATTGC	1140
15	TAGCTATAAT TAAGAATAAC CTTTTATAAT TTCTTCAATG TTAAATGCAT GTTGATCATC	1200
	TTCAAGAATA TACTATATGA CTAGTCGTTG GAAAACTAAT GTGTCATCT TATTTCTTTT	1260
20	ACAGGTGACA AATCAATGAT CAAGAACCGT TACATTCAATT TGACCGAAGA AATGCTTGAG	1320
	GAGCACCCAA ACATTGGTGC TTATATGGCT CCATCTCTCA ACATACGCCA AGAGATTATC	1380
	ACTGCTGAGG TACCTAAACT TGGTAAAGAA GCAGCATTGA AGGCTCTTAA AGAATGGGGT	1440
30	CAACCAAAGT CCAAGATCAC CCATCTTGTAA TTTTGTACAA CCTCCGGTGT AGAAATGCC	1500
	GGTGCAGATT ACAAACTCGC TAATCTCTTA GGCTTGAAA CATCGGTTAG AAGGGTGATC	1560
35	TTGTACCATC AAGGTTGCTA TGCAGGTGGA ACTGTCTTC GAACTGCTAA GGATCTTGCA	1620
	GAAAATAACG CAGGAGCAG AGTTCTTGTG GTGTGCTCTG AGATCACTGT TGTTACATTT	1680
	CGTGGGCCCTT CCGAAGATGC TTTGGACTCT TTAGTAGGTC AAGCCCTTTT TGGTGATGGG	1740
45	TCAGCAGCTG TGATTGTTGG ATCAGATCCA GATGTCTCCA TTGAACGACC CCTCTTCCAA	1800
	CTTGTTCAG CAGCACAAAC GTTTATTCTT AATTCAAGCAG GTGCTATTGC GGGTAACCTA	1860
50	CGTGAGGTGG GACTCACCTT TCACTTGTGG CCTAATGTGC CTACTTTGAT TTCCGAGAAC	1920
55		
60		
65		

ATAGAGAAAT GCTTGAATCA GGCTTTGAC CCACCTGGTA TTAGCGATTG GAACTCGTTA	1980
TTTTGGATTG CTCACCCCTGG TGGCCCTGCA ATTCTTGATG CAGTTGAAGC AAAACTCAAT	2040
TTAGAGAAAA AGAAACTTGA AGCAACAAGG CATGTGTTAA GTGAGTATGG TAACATGTCT	2100
AGTGCATGTG TCTTGTAT TTTGGATGAG ATGAGAAAGA AATCCCTAAA GGGGGAAAAA	2160
GCTACCACAG GTGACGGATT GGATTGGGN GTACTATTG GTTTGGGCC AGGCTTGACC	2220
ATTGAGACCG TTGTGCTGCA TAGCGTTCCCT ATGGTTACAA ATTGAGTGGAA AACCGTAAG	2280
AGAAATGATA TAGGGGACAT GTCTTATTGT ATTACAGAGG AGGTGCTACG AAAGATATGT	2340
ACATGTATCT TCAAAGTTAA TAATAGTACT CCTAAATCTT TTATTCTAT CCTAACATTG	2400
AGGGATTGTA ATTTAGTGAT TGTTGGAGGG TGCAAGTCACG TCAGGCAAGT GGATGAAACT	2460
GCAAGTGCCT GTCATTCTGT TATCGGGGAA TCCTCTAGAG TCCGCRAAAA TCACCAGTCT	2520
CTCTCTACAA ATCTATCTCT CTCTATTTT CTCCAGAATA ATGTGTGAGT AGTTCCCAGA	2580
TAAGGGAATT AGGGTTCTTA TAGGGTTTCG CTCATGTGTT GAGCATATAA GAAACCCTTA	2640
GTATGTATTT GTATTGTAA AATACTCTA TCAATAAAAT TTCTAATTCC TAAAACCAAA	2700
ATCCAGTGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTT	2728
	40

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz I, die aus den folgenden Bestandteilen besteht, die in der 5'-3'-Reihenfolge aneinanderge- 45
reih sind:
 - a) ein zum Bestandteil b) heterologer Promotor, der in Pflanzen stark wirksam ist und/oder der antheren- oder tapetum-spezifisch ist und dem gegebenenfalls ein verstärkendes Element ("Enhancer") vorgesetzt ist;
 - b) eine für Stilbensynthase kodierende DNA-Sequenz; und
 - c) eine 3'-Polyadenylierungssequenz;
 sowie die davon abgeleiteten DNA-Sequenzen.
2. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, wobei als Bestandteil a) ein Pflanzenvirus-Promotor und gegebenen- 50
falls ein Enhancer verwendet wird.
3. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, wobei als Bestandteil a) ein antheren- oder tapetumspezifischer Promotor verwendet wird.
4. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, wobei als Bestandteil a) der CaMV 35S Promotor verwendet wird.
5. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, wobei als Bestandteil a) der CaMV 35S Promotor verwendet wird, 55
dem der CaMV 35S Enhancer vorgeschaltet ist.
6. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, wobei als Bestandteil a) das Konstrukt aus dem CaMV 35S Promotor und dem CaMV 35S Enhancer verwendet wird, welches auf dem Plasmid pSSVst1 enthalten ist.
7. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, wobei als Bestandteil a) das Konstrukt aus dem CaMV 35S Promotor und dem CaMV 35S Enhancer verwendet wird, welches aus den Nukleotiden 1 bis 720 gemäß SEQ ID NO:7 60
oder einer davon abgeleiteten Sequenz besteht.
8. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil b) eine für Resveratrolsynthase kodierende DNA-Sequenz verwendet wird.
9. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil b) eine für Resveratrolsynthase kodierende DNA-Sequenz aus *Arachis hypogaea* oder aus *vitis vinifera* oder deren cDNA verwendet wird.

10. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil b) eine für Resveratrolsynthase kodierende DNA-Sequenz aus *vitis vinifera* oder deren cDNA verwendet wird.

11. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil b) die für Resveratrolsynthase kodierende DNA-Sequenz, die auf dem Plasmid pSSVst1 enthalten ist oder eine davon abgeleitete Sequenz, verwendet wird.

12. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil b) die für Resveratrolsynthase kodierende DNA-Sequenz verwendet wird, welche aus den Nukleotiden 731 bis 2265 gemäß SEQ ID NO: 7 oder einer daraus abgeleiteten Sequenz besteht.

13. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil c) die 3'-Polyadenylierungssequenz, welche in den jeweiligen natürlichen Stilbensynthase-Genen enthalten ist, verwendet wird.

14. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil c) die 3'-Polyadenylierungssequenz, welche im Plasmid pSSVst1 enthalten ist, verwendet wird.

15. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, in welcher als Bestandteil c) die 3'-Polyadenylierungssequenz, verwendet wird, welche aus den Nukleotiden 2266 bis 2485 oder 2266 bis 2728 gemäß SEQ NO: 7 oder einer davon abgeleiteten Sequenz besteht.

16. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, welche aus einer Kombination der Bestandteile a) bis c), welche auf dem Plasmid pSSVst1 enthalten ist oder eine davon abgeleitete Sequenz besteht.

17. DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1, welche aus den Nukleotiden 1 bis 2728 gemäß SEQ NO: 7 oder einer davon abgeleiteten Sequenz besteht.

18. Rekombinante prokaryontische oder eukaryontische DNA, welche die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 enthält.

19. Rekombinante DNA, die in Pflanzen oder Pflanzenzellen enthalten ist und die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 enthält.

20. Vektoren, welche die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder die rekombinante DNA gemäß Anspruch 18 enthalten.

21. Vektor-Plasmid pSSVst1.

22. Transformierte Mikroorganismen, welche die DNA-Sequenz I oder die rekombinante DNA gemäß Anspruch 18 enthalten.

23. *Escherichia coli* Stamm RH pSSVst1 (gemäß DSM 9501) sowie seine Mutanten, welche noch die für die Ausführung der Erfindung wesentlichen Merkmale aufweisen.

24. Transgene Pflanzen (einschließlich Teile dieser Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklingen usw.), die in ihrem Genom die DNA-Sequenz I enthalten und die männlich steril sind und/oder eine gegenüber den entsprechenden Pflanzen, welche die DNA-Sequenz I nicht enthalten, geänderte Blütenfarbe aufweisen sowie die Nachkommen dieser Pflanzen.

25. Transgene Pflanzen gemäß Anspruch 24, welche als DNA-Sequenz I die DNA-Sequenz I enthalten, welche sich auf dem Plasmid pSSVst1 befindet oder welche davon abgeleitet ist.

26. Transgene Pflanzen gemäß Anspruch 24, welche als DNA-Sequenz I die DNA-Sequenz I enthalten, welche aus den Nukleotiden 1 bis 2728 gemäß SEQ ID NO: 1 besteht oder welche davon abgeleitet ist.

40. Verwendung der DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1 und/oder der rekombinanten DNA gemäß Anspruch 18 und/oder der Vektoren gemäß Anspruch 20 und/oder der transformierten Mikroorganismen gemäß Anspruch 22 zur Transformation von Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) und Pflanzen (einschließlich Pflanzenteilen und Samen).

45. Verfahren zur Herstellung der transgenen Pflanzen gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) die DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1 und/oder die rekombinante DNA gemäß den Anspruch 4 in den Genom von Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) einsetzt und gegebenenfalls
- (b) aus den transgenen Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) vollständige transformierte Pflanzen regeneriert und gegebenenfalls vermehrt und gegebenenfalls
- (c) von den so erhaltenen transgenen Pflanzen der Elterngeneration oder weiterer daraus gewonnener Generationen die gewünschten Pflanzenteile (einschließlich Vermehrungsmaterial) gewinnt.

50. Verwendung der transgenen Pflanzen gemäß Anspruch 24 zur Erzeugung von Vermehrungsmaterial sowie zur Erzeugung neuer Pflanzen, die die DNA-Sequenz I gemäß Anspruch 1 oder die rekombinante DNA gemäß Anspruch 18 enthalten und deren Vermehrungsmaterial.

55. Verwendung von DNA-Sequenzen, welche ganz oder teilweise der DNA entsprechen, die als DNA-Sequenz I auf dem Plasmid pSSVst1 enthalten ist, als Sonde zum Nachweis des Gehaltes der DNA-Sequenz I oder ihrer Bestandteile in DNA, welche auf diesen Gehalt untersucht werden soll.

60. Verwendung der für Stilbensynthase kodierenden DNA-Sequenz zur Erzeugung von transgenen Pflanzen, welche männlich steril sind und/oder gegenüber entsprechenden Pflanzen, die diese DNA nicht in ihrem Genom enthalten, eine geänderte Blütenfarbe aufweisen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

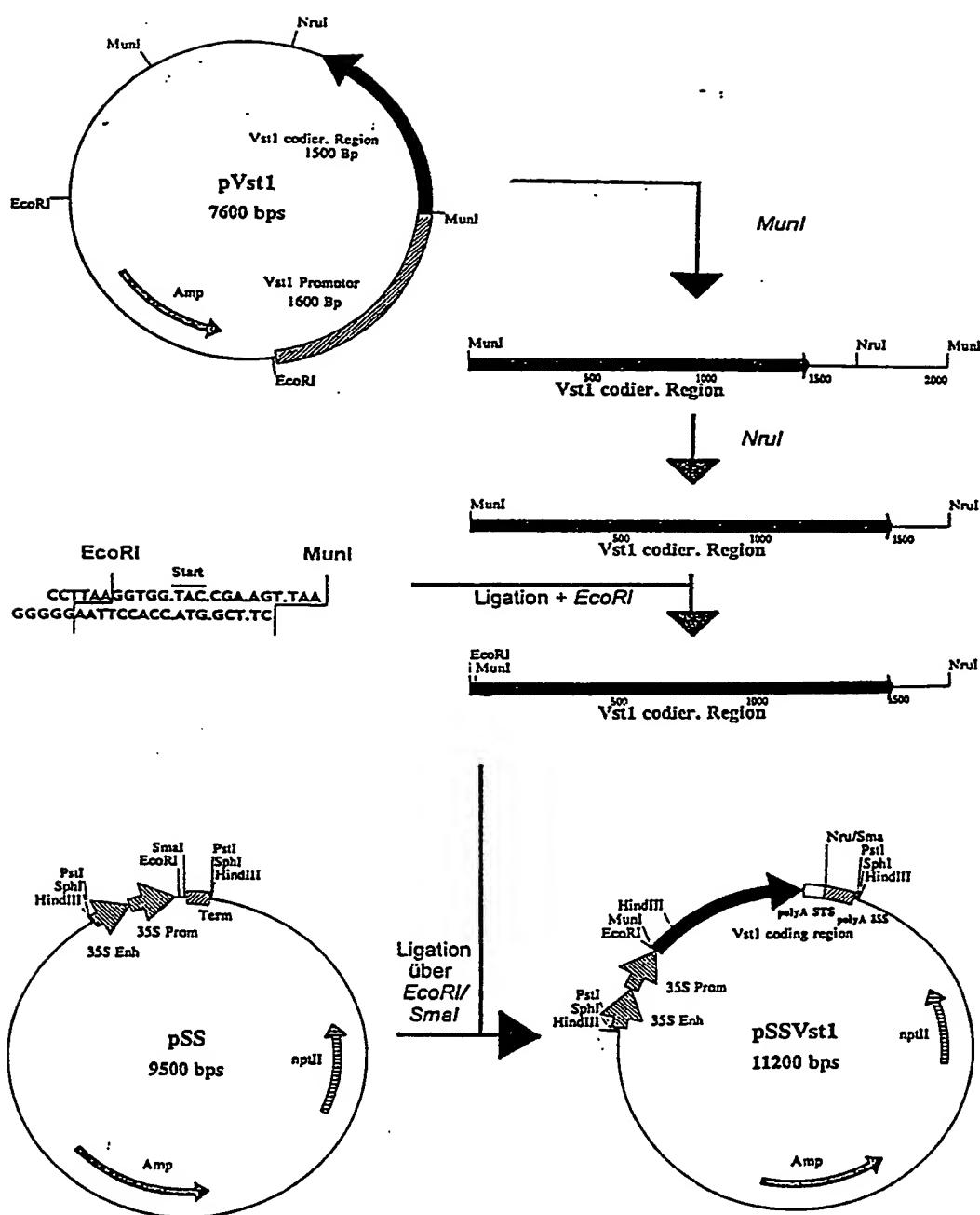


Fig. 1